

老化と核-細胞質間輸送制御

辻井 聡, 岡 正啓

生物が生きていく上で「老化」という現象は、避けて通れない、主に細胞機能低下を呈する生体の生理的な変化である。「細胞老化」という概念をHayflickが提唱して以来、老化制御に関わるシグナル伝達系や制御因子の同定など数多くの研究成果があげられており、老化の分子メカニズムが次第に明らかになってきた。

一方、近年、核-細胞質間の物質輸送制御が老化と関連していることを示唆する報告が増えている。しかしながら、両者がどのように関わっているか、現在のところ明確な見解は得られていない。本稿では、最近の知見を中心に、老化でみられる核-細胞質間輸送制御の異常を紹介するとともに、核-細胞質間輸送の視点から老化の分子メカニズムを捉えてみたい。

1. はじめに

ヒトを含めたさまざまな生物は、発生・誕生後、それぞれの成長過程を経て、時間の経過とともに細胞や組織の機能が低下し、最終的には死に至る。誕生から死ぬまでの時間経過は「加齢」と定義され、成長期を過ぎてからの加齢に伴う生理機能の低下は「老化」と定義されている。老化には、このような「個体の老化」と、限られた分裂寿命を持ち、恒久的な増殖停止状態に陥った「細胞の老化」という二つの概念が存在する。細胞老化が個体老化においてどのように関与しているかは、いまだ明確には示されていないが、老化個体において組織によっては老化細胞が確認されている事実は、それぞれが互いに関連していることを示唆している。近年、この老化をテーマにした研究は飛躍的な進歩を遂げ、老化制御に関わるシグナル伝達系や制御因子が数々同定され、さらにはそれらと老化関連疾患との関係についての解明も進んでいる。興味深いことに、近年、老化に関連した新たな生理現象として核-細胞質間輸送制御の変化が報告され始めている。一般的な老化の印象では、核-細胞質間の輸送能は老化とともに減衰していくも

のと推測されるが、細胞死に至らずに老化状態を維持するためには輸送能が維持されるとも考えられる。本稿では、老化とともに核-細胞質間輸送制御システムにどのような変化が起きているのか、最近の報告を基にまとめたい。

2. 核-細胞質間輸送と老化

細胞内のタンパク質の中には細胞老化とともにその発現量が減少、あるいは増加するものがあり、特にそのタンパク質量が増加するものは、いわゆる老化マーカーとして扱われ、細胞の状態を評価する上で老化の指標とされる。また、老化に伴いその細胞内局在が変化するものとして、核膜を隔てて細胞質側に局在が偏在するもの（サイクリンE¹⁾、ERK1/2²⁻⁴⁾）、対照的に核側に偏在するもの（球状アクチン⁵⁾）などが知られており、これらタンパク質の局在変化を伴った集積は、細胞老化によって特定の輸送経路、あるいは輸送基質の核-細胞質間輸送様式の変化が起きていることを示唆している。

また、核-細胞質間輸送因子であるインポーテイン α やインポーテイン β ファミリーの量が老化とともに減少することが近年報告されていることから⁶⁻¹⁰⁾、上記のタンパク質の局在異常には、やはり核-細胞質間輸送能（核内輸送や核外輸送）の変化が関連するものと思われる（図1）。

また、早老症のHutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS)では、ラミンAの先天的な遺伝子異常（片側の対立遺伝子に点突然変異が生じる）により、ラミンAの前駆体であるプレラミンAに変異が生じたプロジェリントタンパク質が産生されるが、このプロジェリンがドミナントネガティブな効果を有し、正常ラミン

医薬基盤研究所細胞核ダイナミクスプロジェクト（〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-6-8）

Aging and the regulation of nucleo-cytoplasmic transport

Akira Tsujii and Masahiro Oka (Laboratory of Nuclear Transport Dynamics, National Institute of Biomedical Innovation, ZIP:567-0085, 7-6-8, Asagi, Saito, Ibaraki-Shi, Osaka)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870022

© 2015 公益社団法人日本生化学会

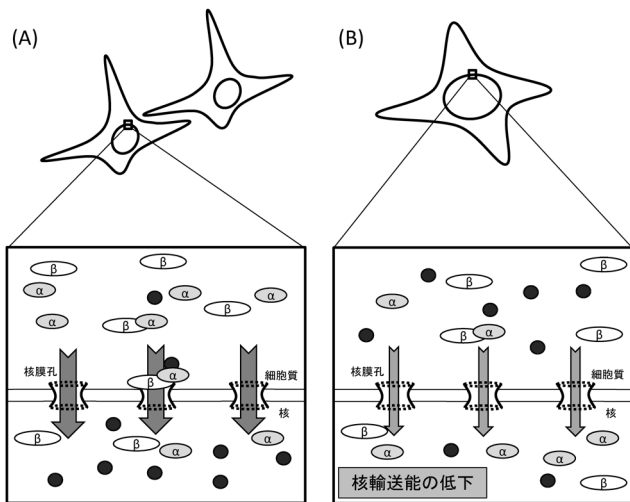


図1 老化によるインポーター α/β 輸送経路の変化
(A) 若い細胞. (B) 老化細胞. α : インポーター α , β : インポーター β , ●: 核タンパク質.

Aの機能を阻害することで、核膜の形態異常を生じる¹¹⁾。また正常の老化においてもこのプロジェリンは蓄積し、核膜形態異常を引き起こすと報告されている¹²⁾。Buschらは、プロジェリンの発現を誘導することによりHGPS患者細胞と類似した状況を作り出したHeLa細胞(子宮頸がん組織由来の細胞)において、インポーター α/β 輸送経路の輸送基質として代表的なSV40ウイルスT抗原の核移行シグナル(nuclear localization signal: NLS)を持ったGFP融合タンパク質の核内輸送効率が低下すること示している¹³⁾。さらにKelleyらは、HGPS患者の線維芽細胞において、能動的な核-細胞質間輸送に重要な役割を持つ低分子量Gタンパク質Ran(Ras-related nuclear protein)の核-細胞質間濃度勾配を調べた。その結果、細胞内のRan総量は健康人の線維芽細胞におけるそれと比較しても差はないが、核内のRanの量が減少することで核-細胞質間濃度勾配が崩れ、さらに、いくつかの核タンパク質の核-細胞質間輸送が減少することを報告している¹⁴⁾。さらに彼らのグループは、HGPS患者細胞においては300kDaを超える巨大な核膜孔複合体構成因子であるTpr(translocated promoter region)が核内移行できないことを突き止めている¹⁵⁾。すなわちこれら一連の結果は、老化細胞と類似した状態であるプロジェリン発現細胞やHGPS患者細胞においては、インポーター α/β 経路や特定の巨大分子に関する核-細胞質間輸送能が低下していることを示している。

一方で、Kim-Kaneyamaらは、分子量が比較的小さなMAPKの一つであるERK1/2(約41kDa)の核内移行が老化細胞において阻害されていることを報告している²⁾。このERK1/2は典型的なNLSを持たずにインポーター β ファミリーの一つであるインポーター γ 依存的に核に運ばれることが知られているが¹⁶⁾、それに対し、インポーター α/β によって運ばれるSV40ウイルスT抗原のNLSを持つタンパク質は老化細胞においても核内移行できるということを同時に報告している。この結果は、前述のBuschらの報告のプロジェリン発現細胞での輸送効率低下とは一見矛盾した結果であるが、プロジェリン発現細胞

もしくはHGPS患者細胞は核-細胞質間輸送効率を制御しているRanの濃度勾配が、一般の老化細胞におけるそれよりも極端に崩壊していること¹⁴⁾に起因する可能性がある。しかしながら、どちらの報告においても経時的に核-細胞質間輸送の効率などの測定を行っていないことから、今後の詳細な解析の報告が待たれる。

以上の報告をまとめると、老化細胞においては特定の核タンパク質についての核-細胞質間輸送能が低下しているものと考えられる。

3. 核膜孔複合体と老化

核膜孔複合体(nuclear pore complex: NPC)は核膜上に存在し、核-細胞質間の唯一の通路として機能している。分子量が小さな分子は自由拡散によりNPCを通過できるが、40kDa以上のものに関しては、輸送因子、あるいはそれに結合した基質以外は核膜孔を通過することはできない。したがって、NPCは選択的な核-細胞質間の物質輸送を担っているのと同時に、バリアとして機能している。NPCは約30種類のヌクレオポリンと呼ばれる核膜孔複合体構成タンパク質により形成され、これらヌクレオポリンはその局在からスカフォールド(Nup107やNup160など)、ペリフェラル(Nup153やNup50など)、トランスメンブレン(Gp210やPom121など)の大きく3種類に分類される(小迫氏の項の図1Aを参照)。Hetzerらは、有糸分裂後細胞においては、老化依存的にスカフォールドヌクレオポリンの機能低下が起り、核膜孔の透過性を上昇させると報告している¹⁷⁾。ペリフェラルヌクレオポリンであるNup153は、有糸分裂後もmRNA発現量が保たれ、タンパク質の翻訳と分解が繰り返される寿命の短いタンパク質であるのに対し、スカフォールドヌクレオポリンであるNup107やNup160は、そのmRNA発現量が減少するが、タンパク質は分解されずに核膜孔に存在し続ける寿命の長いタンパク質であることが示された。寿命の長いタンパク質は、細胞が生存し続ける間にROS(reactive oxygen species)などの酸化ストレスを受けるため、その機能が低下するか、もしくはタンパク質そのものが分解されることが考えられるが、特にスカフォールドヌクレオポリンであるNup93は、Nup107やNup160に比べ、より核膜孔の中心に近く、ROSの影響を受けやすいと考えられ、老化細胞においてそのタンパク質が分解され減少していることが確認された。さらに通常ならば核膜孔を通過できない分子量を持つ物質(70kDaのデキストラン)が、老化細胞においては核内に入ることから、これらのヌクレオポリンの減少や機能低下が核膜バリア機能破綻の原因となっている可能性を示唆している。

また、核膜孔複合体構成因子の一つであるTprの遺伝子を低分子干渉RNA(siRNA)によりノックダウンすると、細胞老化マーカーとして知られるp21やp53の発現上昇や、SA β -gal(senescence associated β -galactosidase)陽性細胞の

増加が確認されることから、老化様変化が誘導されるという報告や¹⁸⁾、前述のNup107をsiRNAにより遺伝子ノックダウンすると細胞分裂を促進するために必要な活性化ERKの核移行を阻害するという報告もあり⁴⁾、これらの事実は、細胞老化における核膜孔機能の重要性を示唆するものと考えられる。

以上の報告から、核膜孔を介する能動的な核-細胞質間の輸送機能は、一般的に細胞の老化とともに減衰していくものと思われる。

4. Ran サイクルと細胞老化

永井らは、正常細胞の細胞老化が進むにつれてRanの発現量が徐々に減少すること、さらに細胞増殖期には主に核に存在するRanが、細胞老化に伴って徐々に細胞質に偏在していくことを示した⁹⁾。これらの事実から、Ranサイクルの変化とそれに伴う核-細胞質間輸送機構の変化が、細胞老化進行に関与しているのではないかと推測した。

そこで、この仮説を実証するために、正常ヒト線維芽細胞(TIG-1)を用いて、Ranに対するsiRNAによる遺伝子ノックダウンを行ったところ、Ranの発現量が低下した細胞では、細胞増殖が急速に停止し、細胞の形態が平坦化するという、老化細胞に特徴的な性状を示した。また、それらの細胞では、細胞老化マーカーであるSA β -galの活性上昇がみられた。さらに、細胞周期の抑制性因子であるp16, p21, p53の発現上昇がみられた。これらの結果より、Ranをノックダウンした細胞は細胞老化を呈することを明らかにした。

さらにRanの発現が低下した細胞では、Ranの機能低下により、本来はGTP結合型Ranに依存して速やかに核外に輸送されるインポータイン α が、核外に移行できずに核に集積することを突き止めている。また、通常の細胞でも継代培養を重ねるにつれて、インポータイン α が徐々に核内に集積していくことがわかった。つまり、インポータイン α が核内集積することと、細胞老化が密接に関連していることが示唆された。

これらの結果を踏まえ、インポータイン α の核外輸送因子であるCAS (cellular apoptosis susceptibility)/エクスポータイン2の発現をsiRNAにより遺伝子ノックダウンさせると、インポータイン α が核内に集積するとともに、SA β -gal活性が上昇するなど、典型的な細胞老化の表現型を示すことを確認した。

以上の結果より、正常細胞では、分裂を繰り返すうちにRanの発現量が低下し、その結果、インポータイン α の核内集積が起こり、核-細胞質間輸送能が全般的に低下していくことが引き金となって、細胞老化が進行するのではないかと考察している。

5. 細胞老化とストレス

細胞老化はさまざまなストレスにより誘導できることが知られており、stress induced premature senescence (SIPS)と呼ばれる。過酸化水素や紫外線照射などのストレス刺激により、増殖能力の高い状態にある細胞を増殖能力の低下した老化状態に誘導できる^{19,20)}。さまざまな老化マーカーが上昇することが確認されており、老化を模倣した状態として老化研究に用いられている。ここでは、ストレス刺激を行った場合の核-細胞質間輸送の変化をまとめる。宮本らは、HeLa細胞において紫外線照射ストレス、酸化ストレス、熱ストレスによりインポータイン α が核内集積することを報告している²¹⁾。彼らの報告では、がん細胞由来の細胞株であるHeLa細胞を使用した実験系であり、それらのストレスと正常細胞でみられる細胞老化現象との関連についてはふれられていないが、酸化ストレスに限って述べると、Frippiatらは150 μ Mの過酸化水素ストレス(2時間)により、ストレス誘導性の老化状態を導くと報告しており¹⁹⁾、この両者の報告を合わせると、宮本らの報告における200 μ Mの過酸化水素ストレス(37°C, 1時間)は細胞老化を誘導しうる、と考えられる。つまり、老化を誘導する濃度の過酸化水素ストレスにより、核輸送因子であるインポータイン α が核内集積することが示唆された。

さらに、彼らはインポータイン α の核内集積はRan勾配の崩壊によるものだとしている。HeLa細胞において、ストレスのない状況下では、内在性のRanは主として核内に局在しているが、酸化ストレス刺激により核だけでなく細胞質にも多く局在するようになり、Ranの濃度勾配が緩くなる。この変化により、CASによるインポータイン α 核外輸送効率が減少し、その結果インポータイン α の核内集積が起こるものととらえている。以上の結果は、先の節であげたTIG-1細胞の老化状態に非常に酷似したものであり、ストレス刺激による細胞老化を誘導すると、Ranの濃度勾配が崩壊し、CAS依存性のインポータイン α 輸送能が低下する結果、核輸送因子インポータイン α が核内集積する、という考えが妥当であることを示していると考えられる。

以上の事実は、通常の継代に伴って起こる細胞老化のみならず、ストレス誘導性の細胞老化においてもRanの濃度勾配の崩壊と核輸送因子インポータイン α の核内集積が核輸送能低下に寄与しうる結果となっている。

6. おわりに

おそらく多くの研究者が想像していたとおり、細胞老化に伴い核輸送能は低下する、という事実が少しずつではあるが実証されてきている。さらに、核-細胞質間輸送関連因子の発現を低下させると細胞老化が誘導できることから、両者は密接な関係にあることが理解できる。

老化の過程では、核-細胞質間輸送を効率的に行うために必要なRanの濃度勾配が崩壊し、核タンパク質を運ぶた

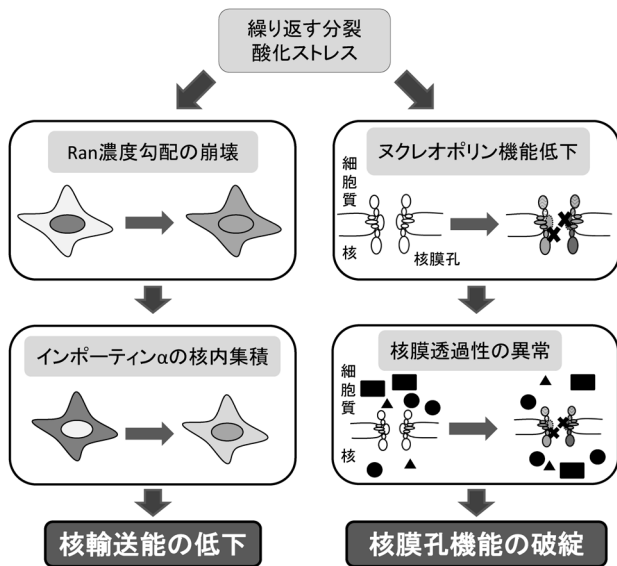


図2 老化による核-細胞質間輸送機構変化の機序

めに必要な核-細胞質間輸送因子が核内に集積し、さらに核輸送の関門となる核膜孔の機能低下が起きる。したがって、核-細胞質間輸送を支える機構の機能が全般的に低下していると考えられる(図2)。

ただし、細胞がいったん老化状態に陥っても細胞は4週間以上生存し続けるという事実や²²⁾、代謝活動が維持されるという事実は²³⁾、老化を維持する機構が存在することを強く支持するものだと考えられる。たとえば細胞周期抑制因子については、核内で機能するためには効率的に安定して核内に運ばれる必要があり、核-細胞質間輸送能の低下は核膜孔を通過するすべての物質の輸送効率に変化を及ぼしているものではないことが予想される。細胞老化における輸送能の低下という現象は、すなわち輸送が止まる、というものではなく、生存するために最低限必要な物質の能動的輸送は保たれている必要があることがうかがえる。今回示した老化に伴う核-細胞質間輸送能低下という現象に対する理論を逆にとると、核-細胞質間輸送効率を一定に保つことが、細胞老化を防ぐ一つの手段となる可能性もあるのではないかと考えられる。今後は、老化維持に重要な物質の輸送効率の変化を探るなど、現状ではまったく知られていない核-細胞質間輸送の視点からの細胞老化維持機構の解明にも期待したい。細胞老化によって生じる輸送機構の変化や、老化を維持する機構がわかれば、老

化制御または老化予防に大きく貢献できる可能性があるのではないかと考えている。

文 献

- 1) Yoshida, A., Yoneda-Kato, N., & Kato, Jun-ya. (2013) *Sci. Rep.*, **3**, doi:10.1038/srep01054.
- 2) Kim-Kaneyama, J., Nose, K., & Shibamura, M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20685–20692.
- 3) Lim, I.K., Won Hong, K., Kwak, I.H., Yoon, G., & Park, S.C. (2000) *Mech. Ageing Dev.*, **119**, 113–130.
- 4) Kim, S.Y., Kang, H.T., Choi, H.R., & Park, S.C. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **401**, 131–136.
- 5) Kwak, I.H., Kim, H.S., Choi, O.R., Ryu, M.S., & Lim, I.K. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 572–580.
- 6) Pujol, G., Söderqvist, H., & Radu, A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 354–358.
- 7) Kim, S.Y., Ryu, S.J., Ahn, H.J., Choi, H.R., Kang, H.T., & Park, S.C. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**, 28–32.
- 8) Park, S.H., Park, T.J., & Lim, I.K. (2011) *Exp. Cell Res.*, **317**, 941–954.
- 9) Nagai, M. & Yoneda, Y. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 2813–2819.
- 10) Ahluwalia, A., Jones, M.K., & Tarnawski, A.S. (2014) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **306**, G338–G345.
- 11) Capell, B.C., Erdos, M.R., Madiqan, J.P., Fiordalisi, J.J., Varga, R., Conneely, K.N., Gordon, L.B., Der, C.J., Cox, A.D., & Collins, F.S. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12879–12884.
- 12) Scaffidi, P. & Misteli, T. (2006) *Science*, **312**, 1059–1063.
- 13) Busch, A., Kiel, T., Heupel, W.M., Wehnert, M., & Hübner, S. (2009) *Exp. Cell Res.*, **315**, 2373–2385.
- 14) Kelly, J.B., Datta, S., Snow, C.J., Chatterjee, M., Ni, L., Spencer, A., Yang, C.S., Cubeñas-Potts, C., Matunis, M.J., & Paschal, B.M. (2011) *Mol. Cell Biol.*, **31**, 3378–3395.
- 15) Snow, C.J., Dar, A., Dutta, A., Kehlenbach, R.H., & Paschal, B.M. (2013) *J. Cell Biol.*, **201**, 541–557.
- 16) Whitmarsh, A.J. (2011) *Mol. Cell Biol.*, **31**, 3512–3514.
- 17) D'Angelo, M.A., Raices, M., Panowski, S.H., & Hetzer, M.W. (2009) *Cell*, **136**, 284–295.
- 18) David-Watine, B. (2011) *PLoS ONE*, **6**, e222423.
- 19) Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J., & Toussaint, O. (2002) *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 1334–1346.
- 20) Rodemann, H.P., Bayreuther, K., Francz, P.I., Dittmann, K., & Albiez, M. (1989) *Exp. Cell Res.*, **180**, 84–93.
- 21) Miyamoto, Y., Saiwaki, T., Yamashita, J., Yasuda, Y., Kotera, I., Shibata, S., Shigeta, M., Hiraoka, Y., Haraguchi, T., & Yoneda, Y. (2004) *J. Cell Biol.*, **165**, 617–623.
- 22) Wang, E. (1995) *Cancer Res.*, **55**, 2284–2292.
- 23) Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., & Funk, W.D. (1999) *Curr. Biol.*, **9**, 939–945.

著者寸描

●辻井 聡 (つじい あきら)

大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝学博士課程在学, (独)医薬基盤研究所・細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・研修生.

■略歴 1982年大阪に生る. 2007年京都府立医科大学医学部医学科卒業後, 大阪大学関連病院にて初期研修. 09年大阪大学整形外科入局し, 関連病院にて後期研修. 12年より大阪大学大学院医学系研究科入学, 15年度博士号取得, 卒業予定.

■研究テーマと抱負 核輸送因子を中心として, 核-細胞質間輸送制御の視点からみた細胞老化メカニズムを明らかにしたいと考えている.

■ウェブサイト

http://www.nibio.go.jp/part/project/nuclear_transport/

■趣味 スポーツ観戦, 読書.

●岡 正啓 (おか まさひろ)

(独)医薬基盤研究所・細胞核輸送ダイナミクスプロジェクト・プロジェクトリーダー, 博士 (医学).

■略歴 1991年埼玉大学理学部卒業, 97年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了, 98年ワシントン大学医学部博士研究員, 2000年フロリダ大学医学部博士研究員, 06年大阪大学大学院生命機能研究科助手, 07年同助教. 2014年より現職.

■研究テーマと抱負 多様化した核-細胞質間輸送システムが高等真核生物に存在する意義を解明するとともに, その病態との関連を明らかにしたい. さらに, これらの知見を活かした創薬を目指している.

■ウェブサイト

https://www.nibio.go.jp/part/project/nuclear_transport/